

**Tumor-cell-HIF1- $\alpha$  is detrimental for vascular functionality  
and required for interaction with inflammatory and tumor  
promoting factor TRAF6 in colorectal cancer**

---

**Dissertation**

zur

Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde

(Dr. sc. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Zürich

von

Jesús Francisco Glaus Garzón

aus

Schweiz und Mexiko

**Promotionskomitee**

Prof. Dr. Roland Wenger (Vorsitz)

Prof. Dr. Lubor Borsig (Leitung)

Prof. Dr. Michael Hottiger

Prof. Dr. Michele De Palma

Zürich, 2016

# TABLE OF CONTENTS

|                                                                                                                                                     |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Table of Contents</b>                                                                                                                            | 2  |
| <b>Summary</b>                                                                                                                                      | 4  |
| <b>Zusammenfassung</b>                                                                                                                              | 5  |
| <b>List of Abbreviations</b>                                                                                                                        | 7  |
| <b>Introduction</b>                                                                                                                                 | 10 |
| 1. Colorectal cancer                                                                                                                                | 10 |
| 1.1. Genetic-driven colorectal cancer                                                                                                               | 11 |
| 1.2. Sporadic colorectal cancer                                                                                                                     | 12 |
| 2. Hypoxia                                                                                                                                          | 14 |
| 2.1. Hypoxic response                                                                                                                               | 14 |
| 2.2. Hypoxic response in immune cells                                                                                                               | 17 |
| 2.3. Hypoxia in the gut                                                                                                                             | 20 |
| 3. Angiogenesis                                                                                                                                     | 23 |
| 3.1. Typical molecules involved in angiogenesis                                                                                                     | 23 |
| 3.2. Angiogenesis and cancer                                                                                                                        | 26 |
| 3.3. COX-2-dependent angiogenesis                                                                                                                   | 29 |
| 3.4. Galectin-dependent angiogenesis                                                                                                                | 30 |
| 4. Inflammation and cancer                                                                                                                          | 33 |
| 4.1. NF- $\kappa$ B signaling                                                                                                                       | 33 |
| 4.2. Pattern Recognition Receptors (PRRs)                                                                                                           | 38 |
| 4.3. Tumor microenvironment                                                                                                                         | 44 |
| 5. Scientific aim                                                                                                                                   | 50 |
| 6. References                                                                                                                                       | 51 |
| <b>Results</b>                                                                                                                                      | 63 |
| <u>Manuscript.</u> Hypoxia attenuates the proinflammatory response in colon cancer cells<br>by regulating I $\kappa$ B                              | 63 |
| <u>Manuscript.</u> Cancer-cell-HIF1- $\alpha$ is detrimental for vascular functionality<br>and required for interaction with inflammatory and tumor |    |

## TABLE OF CONTENTS

|                                             |     |
|---------------------------------------------|-----|
| promoting factor TRAF6 in colorectal cancer | 107 |
| <b>Discussion</b>                           | 157 |
| <b>Acknowledgements</b>                     | 166 |
| <b>Curriculum vitae</b>                     | 169 |
| <b>Appendix</b>                             | 171 |

## Summary

Colorectal carcinoma is one of the most frequent occurring cancers in the world with increased mortality due to liver and lung metastasis. Changes in the tumor microenvironment increase cell aggressiveness and immune evasion that promote tumor progression. Inflammation and hypoxia are key factors that modulate the tumor microenvironment. Inflammation recruits and stimulate immune cells that influence tumor development. Hypoxia induces HIF stabilization, which mediates transcriptional gene activation required for angiogenesis, proliferation and invasiveness. We used a syngeneic orthotopic murine model of colorectal cancer to evaluate the role of an impaired tumor-specific hypoxic response (MC-38-HIF-1 $\alpha$ -KD) in leukocyte recruitment, angiogenesis and tumor progression.

HIF-1 $\alpha$ -KD tumors were smaller with reduced infiltration of granulocytes but increased recruitment of inflammatory monocytes. HIF-1 $\alpha$ -KD tumors were less hypoxic and had a stabilized and functional vasculature. RNA sequencing data of sorted tumor cells revealed downregulation of pro-angiogenic molecules (Cyr61 and COX-2) and upregulation of vessel-stabilizing factors (Pdgfa and Endostatin) in HIF-1 $\alpha$ -KD cells.

TRAF6 was predicted to interact with HIF-1 $\alpha$  *in silico*. Binding was confirmed by immunoprecipitation of either TRAF6 or HIF-1 $\alpha$ . Role of TRAF6 in tumor progression was evaluated *in vivo*. MC-38-TRAF6-KD cells showed a reduced metastatic potential and rarely grew in orthotopic model. In subcutaneous model, LPS stimulation impaired TRAF6-KD tumor development by reducing cell proliferation and increasing apoptosis. TRAF6-KD tumors had increased infiltration of myeloid cells with anti-tumorigenic phenotype that suggests an intact tumor-specific inflammatory response is required for modulation of the tumor microenvironment.

## Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom gehört zu den weltweit häufigsten Krebsarten, das aufgrund nachfolgender Lungen- und Lebermetastasen mit einer erhöhten Mortalitätsrate einhergeht. Veränderungen in der Mikroumgebung eines kolorektalen Karzinoms können die Aggressivität der Karzinomzellen erhöhen und ihnen helfen dem Immunsystem zu entgehen. Dies begünstigt das Fortschreiten der Tumorbildung. Schlüsselfaktoren solcher Veränderungen sind Entzündungen und Hypoxie. Entzündungen rekrutieren und stimulieren Immunzellen, die wiederum die Tumorentwicklung beeinflussen. Hypoxie induziert die Stabilisierung von HIF, das für die transkriptionale Genaktivierung der Angiogenese, der Proliferation und der Invasion von Tumorzellen benötigt wird. Um den Einfluss einer gestörten tumorspezifischen Hypoxieantwort (MC-38-HIF-1 $\alpha$ -KD) auf die Leukozytenrekrutierung zu untersuchen, wurde ein syngenes orthotopes Mausmodell für kolorektalen Krebs verwendet.

HIF-1 $\alpha$ -KD-Tumoren waren kleiner und zeigten eine verminderte Infiltration durch Granulozyten, jedoch war die Rekrutierung inflammatorischer Monozyten erhöht. Dazu war die Hypoxie in HIF-1 $\alpha$ -KD-Tumoren geringer und die Blutgefäße waren stabil und funktionstüchtig. Mittels RNA-Sequenzierung dieser Tumorzellen konnte eine verminderte Transkription für angiogene Proteine (Cyr61 und COX-2) bei gleichzeitig erhöhter Transkription für gefäßstabilisierende Faktoren (Pdgfa und Endostatin) festgestellt werden.

*In silico* wurde TRAF6 als möglicher Interaktionspartner von HIF-1 $\alpha$  identifiziert. Sowohl mit der Immunopräzipitation von TRAF6 als auch von HIF-1 $\alpha$  konnte die Interaktion der beiden Proteine bestätigt werden. Die Rolle von TRAF6 für die Tumorentwicklung wurde *in vivo* untersucht. MC-38-TRAF6-KD-Zellen zeigten ein geringeres metastatisches Potenzial und konnten sich im orthotopen Modell kaum vermehren. Wurden die TRAF6-KD-Tumorzellen subkutan injiziert, verminderte eine Stimulation mit LPS die Tumorentwicklung aufgrund geringerer Proliferation und verstärkter Apoptose der Tumorzellen. TRAF6-KD-Tumoren

## ZUSAMMENFASSUNG

zeigten eine erhöhte Infiltration durch myeloide Zellen mit einem anti-tumorigenen Phänotyp.

Dies deutet darauf hin, dass eine intakte, tumorspezifische Reaktion auf Entzündungen benötigt

wird, um die Mikroumgebung des Tumors zu modulieren.